

UNIVERSITÉ DE LYON

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE - N° 104

ÉTUDE
SUR
L'HOMOGENÉISATION DES CRACHATS
POUR LA RECHERCHE DU
BACILLE TUBERCULEUX

THÈSE
POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 8 Juin 1925

PAR

André TERCINET

Pharmacien de 1^{re} classe
Licencié ès-Sciences

né à PARIS (Seine) le 2 Novembre 1896



LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU
42, Quai Gailleton, 42
Téléphone 63-56

1925

**ÉTUDE SUR L'HOMOGENÉISATION DES CRACHATS
POUR LA RECHERCHE DU BACILLE TUBERCULEUX**

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année Scolaire 1924-1925 N°

234

ÉTUDE

SUR

L'HOMOGENÉISATION DES CRACHATS

POUR LA RECHERCHE DU

BACILLE TUBERCULEUX

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 8 Juin 1925

PAR

André TERCINET

Pharmacien de 1^{re} classe

Licencié ès-Sciences

né à PARIS (Seine) le 2 Novembre 1896



LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

Téléphone 63-56

1925

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen honoraire	M. H. HUGOUNENQ
Doyen	M. J. LEPINE.
Assesseur	M. ROQUE.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. AUGAGNEUR, CAZENEUVE, FLORENCE (A.), TEISSIER.

PROFESSEURS

Cliniques médicales	MM. BARD.
	ROQUE.
Cliniques chirurgicales	TIXIER.
	BERARD.
Clinique obstétricale et Accouchements.....	COMMANDEUR.
Clinique ophtalmologique	ROLLET.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....	NICOLAS.
Clinique neurologique et psychiatrique.....	LEPINE (J.).
Clinique des maladies des enfants.....	MOURQUAND.
Clinique des maladies des femmes.....	VILLARD.
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	LANNOIS.
Clinique des maladies des voies urinaires.....	ROCHET.
Clinique chirurgicale, infantile et orthopédie.....	NOVE-JOSSERAND.
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie.....	CLUZET.
Chimie biologique et médicale.....	HUGOUNENQ.
Chimie organique et Toxicologie.....	MOREL.
Matière médicale et Botanique.....	BRETIN.
Parasitologie et Histoire naturelle médicale.....	GUIART.
Anatomie	LATARJET.
Histologie	POLICARD.
Physiologie	DOYON.
Pathologie Interne	COLLET.
Pathologie et Thérapeutiques générales.....	X.
Anatomie pathologique	PAVIOT.
Chirurgie opératoire.....	PATEL.
Médecine expérimentale et comparée et bactériologie.....	ARLOING (F.).
Médecine légale	Etienne MARTIN.
Hygiène	COURMONT (P.).
Thérapeutique, Hydologie et Climatologie.....	PIC.
Pharmacologie	X.

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Chargé d'un cours de Pathologie externe.....	MM. VALLAS.
— — Propédeutique de gynécologie.....	CONDAMIN.
— — Chimie minérale	BARRAL.
— — Urologie	GAYET.

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

Orthopédie	MM. LAROYENNE.
Puériculture et hygiène de la première enfance.....	CHATIN.
Stomatologie	TELLIER.

AGREGES

MM.	MM.	MM.	MM.
NOGIER.	COTTE.	CORDIER (V.).	MAZEL.
THEVENOT (Léon)	DUROUX.	ROUBIER.	SANTY.
GARIN.	TRILLAT.	FAVRE.	DUNET.
SAVY.	SARVONAT.	BONNET.	CHALIER (André).
FROMENT.	FLORENCE (G.).	RHENTER.	CHALIER (Joseph).
THEVENOT (Lucien).	ROCHAIX.	LEULIER.	NOEL.
PIERY.			CORDIER (Pierre).

M. BAYLE, secrétaire.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. GUIART, président ; ARLOING, assesseur ;

THÉVENOT Lucien et ROUBIER, agrégés.

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MON MAÎTRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR JULES GUIART,

Professeur de Parasitologie

à la Faculté de Médecine et Pharmacie de Lyon

A MON PÈRE,

PIERRE TERCINET,

Pharmacien - Ex-Interne des Hôpitaux

Deux fois lauréat de l'Ecole Supérieure de Paris
(*médaille d'or, médaille d'argent*)

en gage de ma gratitude filiale
et de ma sincère admiration.

A TOUS LES MIENS

ÉTUDE SUR L'HOMOGÉNÉISATION DES CRACHATS
POUR LA RECHERCHE DU BACILLE TUBERCULEUX

PRÉFACE

Avant d'entreprendre ce travail, il convient de dire que nous avons souvent été découragés de le faire, tant il semblait que la question de « *l'homogénéisation des crachats* » était étudiée une fois pour toutes et que le dernier mot avait été dit. Cependant, à la pratique courante de cette opération de laboratoire, il nous est apparu qu'elle offrait bien quelques petites difficultés, surtout lorsqu'on doit la pratiquer avec le matériel restreint dont dispose un laboratoire d'analyses adjoint à une pharmacie.

Nous avons pensé alors que les difficultés résidaient dans le fait que la plupart des méthodes d'homogénéisation avaient été établies « de façon empirique », selon l'aveu même d'un de leurs auteurs ; ou du moins, qu'utilisant des réactions aujourd'hui bien connues de la chimie biologique, elles n'avaient pas été soumises aux critiques de la chimie. C'est le travail que nous avons entrepris.

L'étude chimique et systématique de l'homogénéisation des crachats a le double avantage qu'elle éclaire certaines questions de la composition chimique des crachats pathologiques et que, d'autre part,

elle nous a permis d'adopter définitivement une méthode à laquelle nous avons apporté une légère modification. Les critiques pourront se récrier que la liste de ces méthodes et de leurs modifications était déjà assez longue. A cela, nous répondrons que nous avons jugé ces méthodes d'après le point de vue unique d'être pratiques et abordables par les petits laboratoires. Depuis que la bactériologie a pris l'extension que l'on sait, le pharmacien, à qui sont remises la plupart des analyses, avait l'habitude de passer celles-ci en sous-main à des laboratoires confortablement installés et où le travail pouvait se faire en toute tranquillité d'esprit. Mais il faut bien convenir que, ce faisant, le pharmacien se privait d'une des joies les plus précieuses de son métier et petit à petit, surtout depuis la guerre, il s'est créé, dans le milieu des étudiants en pharmacie, une mentalité spéciale. Ils veulent être les vrais auxiliaires du médecin, et puisque leurs études les préparent à être des hommes de laboratoire, ils ont retenu chez eux les analyses. Il s'est fait des efforts louables de tous côtés, pour apporter dans les recherches bactériologiques des méthodes simples et qui conviennent au temps limité et au matériel relativement restreint dont dispose généralement le pharmacien. Peut-être aurons-nous eu la main assez heureuse pour être de ceux-là.

Je dois, à cette place, remercier les nombreux médecins qui m'ont encouragé.

Mon témoignage de profonde gratitude va tout spécialement à M. le Professeur Guiart, qui a bien voulu accepter la présidence de cette thèse.

Je remercie de tout cœur ses assesseurs : M. le Professeur agrégé Garin, M. le Docteur Massia, chef de travaux de parasitologie, dont le cordial accueil a été pour moi un réconfort dans l'entreprise d'un travail sur un terrain battu et difficile.

M. Ramon, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, a droit aussi, pour ses précieuses directives, à ma reconnaissance toute particulière. Qu'il veuille bien la trouver dans ces quelques lignes écourtées, mais sincèrement cordiales.

AVANT-PROPOS

Nous ne voulons pas refaire l'historique de l'homogénéisation des crachats pour la recherche du bacille tuberculeux, que d'autres plus qualifiés ont retracé, mais nous devons cependant noter que les modifications qu'elle a subies dans ces dernières années, ont tenu :

1° A la notion de densité qui a été introduite par Dilg et étudiée par Bezançon et Philibert ;

2° A la recherche de la diminution du taux de dilution que l'on doit faire subir au crachat.

La notion de densité a été le point le plus important acquis en faveur de l'homogénéisation. En effet, jusque-là, les méthodes les plus diversement imaginées, selon le gré ou la fantaisie d'un auteur, apportaient peu de chances supplémentaires de trouver le bacille isolé. Tout au plus permettaient-elles, si ceux-ci se trouvaient dans un « bouchon », de les disséminer et de faciliter de ce fait leur trouvaille, mais le bacille, rare dans un crachat ne présentant pas de

particules condensées, n'avait pas beaucoup plus de chances d'être trouvé qu'à l'examen direct. Aussi, l'on comprend le bien-fondé des critiques, qui prétendaient qu'un « examen direct attentif et scrupuleux » donnait un résultat positif dans la plupart des cas de présence du bacille, sans avoir besoin de recourir aux méthodes d'homogénéisation. C'est alors que Nebel et Dilg émettent l'idée que le bacille tuberculeux a une densité oscillant entre 1010 et 1080.

Bezançon et Philibert, reprenant cette étude, la mettent complètement au point, si bien qu'ils établissent une méthode aujourd'hui classique et qui a fait de l'homogénéisation une opération courante de laboratoire. Elle a pratiquement (nous ne disons pas : généralement) remplacé l'inoculation aux cobayes, et le bactériologiste ne se permettrait pas aujourd'hui de donner un résultat d'analyse négatif, sans avoir fait l'homogénéisation.

La seconde modification, beaucoup moins importante et issue de la première, vient de ce que le procédé Bezançon a comme donnée la dilution du crachat dans dix fois son volume d'eau. Ce taux, assez peu gênant, dans quelques cas, le devient dans un grand nombre d'autres. En effet, la quantité de crachats soumise à l'analyse est en moyenne de 10 à 15 centimètres cubes (voire 20, 30 et plus) ; en multipliant par 10, on se trouve en présence d'une solution de 100 à 150 centimètres cubes qu'on ne peut centrifuger que dans une grosse centrifugeuse, ou alors, si l'on n'a qu'une petite centrifugeuse (à main ou électrique) dont les tubes ne contiennent que 10 à

12 centimètres cubes, il faut faire l'opération en plusieurs fois.

C'est là un désavantage qui peut ne pas frapper au prime abord, mais qui, en réalité, est très gênant dans la pratique courante. Une modification a donc été apportée au procédé Bazançon ; c'est le procédé aux oxydants alcalins concentrés (hypochlorites, hypobromites, en solutions concentrées : Liqueur de Labarraque, eau de Javel, solution d'hypobromite Yvon). Avec ces procédés, la dilution est très faible. On emploie généralement une quantité de solution égale à celle du crachat, autant d'alcool, pour faire baisser la densité, de sorte qu'en fin de compte on a dilué le crachat de trois fois son volume. C'est un progrès sérieux, qui fait de ces procédés des procédés de choix.

Toutefois en opérant ainsi on est frappé de l'abondance du précipité obtenu dans le culot du tube de la centrifugeuse, précipité tel que l'on pourrait préparer 20 ou 30 lames pour avoir des chances de trouver le ou les bacilles isolés. C'est un désavantage sérieux puisque, tout aussi bien, si l'on avait le temps de faire de tels préparatifs pour une recherche de bacille tuberculeux, on pourrait les faire directement, sans passer par l'homogénéisation.

C'est alors que nous avons entrepris d'analyser ce dépôt pour voir si nous pourrions nous en débarrasser. L'analyse nous en a révélé la nature, ainsi que la presque impossibilité de le remettre en dissolution.

Nous avons alors cherché un biais en modifiant la « viscosité » du milieu. Nous en donnerons plus loin

l'exposé complet. En attendant nous pouvons dire que notre procédé nous a donné toute satisfaction et que des crachats positifs dans la proportion de 1 bacille par 20 champs à l'examen direct, de 1 bacille par champ à l'homogénéisation ordinaire l'étaient dans la proportion de 7 à 8 bacilles par champs avec notre procédé. Il augmente donc les chances de trouver le bacille isolé dans de sérieuses proportions, tout en n'exigeant que des moyens très limités.

CHAPITRE PREMIER

Composition chimique du crachat pathologique

Le crachat soumis à l'analyse est un milieu dont la nature varie de façon très appréciable, selon les cas, et l'étude magistrale que donne MM. Bezançon et S. I. de Jong, dans leur *Traité de l'examen des crachats*, a mis au point de façon définitive cette composition qui tendait à devenir confuse du fait de l'abondance des publications parues sur le crachat pathologique. Très souvent, un auteur (et nous sommes obligés de reconnaître que l'Allemagne en fut prodigue) trouvait un élément nouveau auquel il attachait une grande importance au point de vue diagnostic; il s'attachait à trouver un réactif, qui colorât cet élément de façon toute particulière, de sorte qu'en quelques années la littérature relative à l'examen microscopique des crachats se trouva encombrée d'une multitude d'éléments que le praticien retrouvait rarement, et dont l'importance lui était cependant donnée comme certaine.

De l'étude serrée qui a été faite de la question, il ressort que l'on peut classer les crachats, selon leur apparence, en :

Crachats	{	Homogènes	{	Crachats muqueux.
			{	Crachats purulents.
			{	Crachats séreux.
			{	Crachats hémorragiques.
	{	Hétérogènes	{	Crachats muco-purulents.
			{	Crachats muco-séreux.
			{	Crach. séro-sanguinolents.
			{	Cr. sang.-m.-purulents (1).

Crachats muqueux

Ce crachat n'est composé que d'eau et de mucine. La mucine est un albuminoïde, dont le caractère essentiel est de s'hydrolyser sous l'influence des acides, en fournissant un sucre azoté réducteur : la glucosamine.



La mucine précipite par l'acide acétique en solution faible (3 %), et l'on a pu effectuer des dosages de mucine dans les crachats, grâce à la glucosamine. « Comme la glucosamine et le glucose ont sensiblement le même pouvoir réducteur, on peut faire le dosage en se basant sur les chiffres admis pour le glucose. » (2)

(1) Guiart et Grimbert.

(2) Bezançon et S. I. de Joug.

10 gr. lig. de Fehling sont réduits par : 0 gr. 05 de glucose, 0 gr. 047 de glucosamine.

On sait aussi que 100 parties de mucine correspondent à 33,6 de glucosamine. A l'aide de ces données, on a établi que le crachat des phtisiques atteint 0,7 % de mucine, le crachat des pneumoniques 1 %; dans la bronchite chronique 1,5 à 3,5 %, et pas de mucine dans le crachat purulent de la bronchectasie. Cette mucine est principalement d'origine bronchique. Elle serait la production des cellules bronchiques et des glandes muqueuses de l'épithélium trachéo-bronchique, qui, sous l'action de la moindre irritation, prendraient le type mucipare. Elle est aussi d'origine buccale, et les glandes sous-maxillaires produisent une salive qui en est riche. Cette mucine ne diffère en rien de la mucine bronchique. Elle donne bien de la glucosamine par hydrolyse, et nous avons essayé la coloration au bleu de Unna qui, d'après Bezançon, permet de distinguer au microscope la mucine (grâce à la coloration rougeâtre qu'elle prend), nous avons obtenu en tous points cette coloration rougeâtre.

Au crachat muqueux, il convient de rattacher les fameux moules fibrineux et les spirales de Curschmann, qui ne sont, comme l'ont montré MM. Bezançon et de Jong, que des « assemblages de mucus très épais » et « des squelettes de cellules dégénérées ». D'après ces auteurs, qui ont fait une étude minutieuse de la question, la fibrine est pour ainsi dire absente du crachat, même dans la pneumonie. On la trouverait à l'état de traces dans des cas assez rares.

Crachat séreux

Ce sont les mêmes auteurs qui ont mis en évidence la présence fréquente d'exsudat séro-albumineux dans l'œdème pulmonaire et dans la pneumonie.

Crachat hémorragique

Le crachat purement hémorragique est excessivement rare, et, le plus souvent, le sang n'existe que mêlé à d'autres éléments dans un crachat qui sera déjà muco-purulent ou muco-séreux.

Crachat purulent

Nous avons réservé en dernier celui-ci, à cause de l'importance que nous lui attachons. Les crachats soumis à l'analyse manquent bien rarement de leucocytes. Il est de notion courante que le leucocyte, agent de défense de l'organisme, apparaît en même temps que le microbe. Mais il nous a semblé que l'on n'avait pas fait le rapprochement nécessaire entre la présence du pus et la présence de l'albumine dans le crachat. La recherche de l'albumine dans le crachat, étudiée et mise au point par Roger, qui a établi une méthode de recherche de l'albumine vraie (sérine et globuline), après avoir paru une réaction spécifique de la tuberculose, n'a plus semblé que le réaction des « processus inflammatoires profonds », tant le rayon d'albumino-réactions positives s'étendait. En réalité, après avoir pratiqué systématiquement cette recherche, nous sommes obligés de reconnaître avec MM. Be-

zançon et Bard qu'on trouve toujours des traces d'albumine dans le crachat. L'un de ces auteurs fait la réflexion suivante, qui est significative : « On sait combien les cliniciens se trouvent souvent embarrassés lorsque, lisant le compte rendu d'une analyse d'urines, ils voient noter des traces d'albumine. Ils ne savent pas dans quelle mesure ils doivent attacher de l'importance à cette constatation. Dans les crachats où il existe toujours — pourvu qu'on la recherche correctement — une petite quantité de matières albuminoïdes et où, très facilement, pour peu que les éléments histologiques y soient altérés, on trouve des albumoses, la constatation des traces d'albumine est presque sans valeur. » Sans valeur ? Certes, mais provenant d'albuminoïdes ; pourquoi ? L'analyse d'urine qu'invoque Bezançon éclaire justement cette question. Dans une urine qui contient du pus, le chimiste sait qu'il retrouvera à coup sûr de l'albumine et de l'albumine vraie (le pus contient 1 à 4 % de sérine et globuline), si bien qu'il mentionnera à côté du mot albumine : « albumine du pus », lorsque la dose n'excède pas 0 gr. 20 à 0 gr. 30 par litre (au delà, il y a albuminurie indépendante du pus).

Dès lors, quoi d'étonnant à ce qu'un milieu purulent comme le crachat pathologique renferme des traces d'albumine, surtout lorsqu'on sait que les réactifs, même spécifiques de la sérine et de la globuline (acide nitrique), le sont à des doses infinitésimales (1 pour 100.000).

Comme la présence d'albumine intéressant le médecin au point de vue diagnostice n'est que celle de

l'exsudat séro-albumineux, nous croyons que l'examen microscopique avec coloration au bleu de Unna (l'exsudat apparaît en gouttes violettes) a beaucoup plus de valeur que la recherche chimique.

De quelques autres composants chimiques du crachat

Le crachat renferme, outre les éléments organiques que nous venons de voir, bien des éléments minéraux. Leur ensemble donne au crachat une réaction alcaline au tournesol et rentre à la phénolphthaléine. Il semble donc qu'il y aurait quelque intérêt à déterminer cette alcalinité en *pH*.

Mais, après avoir essayé cette détermination, nous avons constaté que l'échelle de variation était d'une trop grande importance (elle était comprise entre 7,9 et 9) pour qu'on puisse lui attacher une signification quelconque. C'est qu'en effet le crachat n'est jamais un produit d'expectoration immédiate. Il a séjourné dans les bronches et subi un commencement de fermentation, si bien qu'en quelques minutes, on n'a plus la figuration exacte de l'exsudat bronchique.

Nous verrons cependant que cette notion ne peut laisser le chimiste indifférent, certaines réactions étant étroitement tributaires du *pH*.

1. — *Les chlorures*

Ils existent normalement (2 pour 1.000) dans le crachat; et leur dosage comparatif avec les chlorures de l'urine, a donné lieu à de très intéressantes consi-

dérations sur l'évolution de la maladie, surtout dans la pneumonie.

2. — *L'acide exalique*

Signalé à des doses variables et sans que l'on sache l'importance à lui attribuer.

3. — *Des phosphates*

Le plus important est le phosphate de spermine constituant les magnifiques cristaux de Charcot-Leyden. Ceux-ci ont bien la forme cristalline des phosphates, mais, n'ayant pu être isolés à l'état pur, la composition qui leur est attribuée ne repose que sur des présomptions.

4. — *Des lipoides et des graisses*

Les crachats traités par l'éther cèdent à celui-ci des graisses dont quelques-unes présentent le phénomène de la croix au microscope polarisant. Du reste, on trouve, dans quelques cas très rares, des cristaux de cholestérine.

5. — *De la tyrosine*

Trouvée à l'état de cristaux, avec leur forme caractéristique, dans des cas aussi très rares, la tyrosine est cependant un élément fréquent des crachats purulents. On a fait beaucoup de cas, en ces dernières années, de la présence de la tyrosine dans les crachats. Comme pour l'albumine, au début, on en a fait une réaction spécifique de la tuberculose, et la « *tyrosino-réaction* » était appelée à remplacer l'albumino-

réaction défailante. Voici l'opération telle qu'elle est décrite par son auteur : « Les crachats sont additionnés du double de leur volume d'eau bouillante et triturés soigneusement avec un agitateur en verre pour dissoudre la tyrosine peu soluble dans l'eau. Filtrer après 10 minutes de contact. Recueillir 10 cm³ de filtrat dans un tube à essai assez large. Ajouter 8 à 10 gr. de macération glycérinée de *Russula delica*, en ayant soin d'agiter plusieurs fois pour rendre le mélange homogène. Abandonner à la température du laboratoire. Au bout d'un temps variable, apparaît une coloration allant du brun clair au brun foncé. Cette réaction est basée sur la coloration de la tyrosine au contact d'une oxydase (*tyrosinase*) abondante dans les champignons du genre *Russula*. L'auteur ne la donne pas comme absolument spécifique de la tuberculose, du moins il admet que les cas, où la tyrosine « résultat de l'hydrolyse du tissu pulmonaire » apparaît en dehors de la tuberculose, sont assez rares.

Pour contrôler cette réaction, nous avons fait appel à un autre réactif de la tyrosine, puisque réactif des acides-animés : la *ninhydrine* (hydrate de tricétohydrindène) et qu'Abderhalden emploie pour la recherche des acides-animés dans le sang (diagnostic de la grossesse. Ce composé organique en solution à 1 pour 100 donne une belle coloration violette au contact des acides-animés. Cette réaction est instantanée si l'on chauffe légèrement. Nous avons donc ajouté au filtrat obtenu comme précédemment, après trituration du crachat avec de l'eau bouillante, 1 ou 2 gouttes de solution de ninhydrine à 1 pour 100.

Nous avons obtenu une réaction positive dans la majorité des cas. Très exactement, nous avons obtenu 68 réactions positives sur 82 crachats examinés (les crachats qui furent négatifs étaient presque purement salivaires). La tyrosine serait donc un élément à peu près constant du crachat purulent, et il faudrait admettre que celui-ci contiendrait très rapidement des produits d'hydrolyse.

Comment expliquer la différence de résultat avec la tyrosinase ?

Nous avons pu comparer les deux réactifs, grâce à l'amabilité de la maison Byla (1), qui a bien voulu mettre à notre disposition de la macération de *Russula delica* (ce réactif est en effet très difficile à trouver ; quelques chimistes seuls, que la réaction de la tyrosine intéresse, pensent à faire une récolte de *Russula* au moment de sa maturité).

L'examen comparatif de la sensibilité est nettement en faveur de la tyrosinase. En effet, la ninhydrine, dite sensible à 1 pour 1.000 par Abderhalden, ne l'est effectivement qu'à 1 pour 400, c'est-à-dire que la réaction apparaît en quelques minutes pour cette teneur. Elle apparaît encore très faiblement jusqu'à 1 pour 600, mais au bout de plusieurs heures. Par contre, la coloration brune au contact de la solution de tyrosinase est effectivement sensible pour une solution à 1 pour 1.200 (apparition de la couleur en quelques minutes), elle apparaît encore au bout de quelques heures pour une solution à 1 pour 1.500.

(1) 26, avenue de l'Observatoire, Paris (14^e).

On voit donc que l'on ne pouvait incriminer l'oxydase de *Russula* de manquer de sensibilité et de ne déceler que les doses massives de tyrosine.

C'est alors que nous avons pensé à l'influence que pouvait avoir la réaction du milieu. Si l'on dispose une série de tubes contenant :

une solution de tyrosine à 1 pour 200 ;

une solution-tampon de phosphate disodique à $m/15$;

une solution de NaOH N/10 en doses croissantes ;

une solution d'HCl N/10 en doses décroissantes,

on s'aperçoit que la coloration cesse d'apparaître pour une teneur alcaline qu'il est facile de déterminer. Voici le schéma de l'opération :

Solution de tyrosine	Solution de phosphate $m/15$	Sol. NaOH $\frac{N}{10}$	Sol. HCl $\frac{N}{10}$	Macération <i>Russula</i>	
1 cm ³	5 cm ³	0	2 gouttes	2 cm ³	belle color. brun foncé.
1 cm ³	5 cm ³	0	1 goutte	2 cm ³	id.
1 cm ³	5 cm ³	0	0	2 cm ³	id.
1 cm ³	5 cm ³	1 goutte	0	2 cm ³	coloration brun clair.
1 cm ³	5 cm ³	2 gouttes	0	2 cm ³	id.
1 cm ³	5 cm ³	5 gouttes	0	2 cm ³	coloration brun verdâtre.
1 cm ³	5 cm ³	6 gouttes	0	2 cm ³	color. au bout de 10 m.
1 cm ³	5 cm ³	7 gouttes	0	2 cm ³	color. en 20 minutes.
1 cm ³	5 cm ³	8 gouttes	0	2 cm ³	color. en 3/4 d'heure.
1 cm ³	5 cm ³	9 gouttes	0	2 cm ³	pas de coloration.
1 cm ³	5 cm ³	10 gouttes	0	2 cm ³	pas de coloration.

La coloration cesse donc d'apparaître pour une teneur :

Solution de phosphate $m/15$ 5 cm³

Solution NaOH N/10..... 9 gouttes

Si l'on établit le pH d'une telle solution par la méthode colorimétrique, on arrive au $pH = 8,9$. C'est là une teneur alcaline élevée, mais qu'il n'est pas rare de trouver dans les crachats, surtout s'ils ont subi un commencement de fermentation ammoniacale.

La solution de ninhydrine, contrairement à la solution de tyrosinase, reste indifférente à la réaction du milieu.

On voit donc que l'on ne peut attacher une grande importance à la tyrosino-réaction et que, somme toute, la recherche microscopique reste le seul procédé qui garde toute sa valeur. C'est de ce côté que doivent être apportés les perfectionnements.

L'homogénéisation en est un. A ce titre, elle devait nous arrêter.

CHAPITRE II

Etude des méthodes d'homogénéisation et de concentration des crachats

L'opération de laboratoire, qui est habituellement appelée homogénéisation, comporte deux temps :

- 1° l'homogénéisation du crachat proprement dite ;
- 2° la concentration des bacilles.

Ces deux temps ont été l'objet l'un et l'autre des modifications les plus diverses. Comme l'homogénéisation proprement dite est l'opération la plus importante, nous diviserons les méthodes d'après leur processus opératoire en deux classes :

a) *Homogénéisation par simple dissolution*

b) *Homogénéisation par hydrolyse*

A

Homogénéisation par simple dissolution

C'est le cadre le plus vaste des homogénéisations ; nous en ferons deux groupes :

- a) *Dissolution par simple isotonisation*
- b) *Dissolution par intervention d'alcalins*

a) Simple isotonisation

C'est le cas de la méthode de KRAUSS et FLEMING. « On met 5 cm³ de crachats dans un tube à centrifuger de 15 cm³ ; on ajoute 5 cm³ d'une solution de chlorure de sodium à 10 pour 100 et on agite jusqu'à ce que le liquide devienne homogène, sans grumeaux. On ajoute 0 cm³ 5 de gazoline et on agite de nouveau jusqu'à ce que la gazoline soit complètement émulsionnée. On centrifuge lentement, après quoi la gazoline forme un liquide qui surnage une écume dans laquelle se trouveront les bacilles tuberculeux s'il en existe dans les crachats. »

Ce procédé très simple est à rapprocher de quelques autres que nous ne pourrions classer dans les méthodes aux alcalins, bien que leurs solutions soient alcalines, en raison de la non-intervention de l'alcalin dans la solubilisation de la mucine. Ces méthodes sont les suivantes : :

1° MÉTHODE DE KUHNE. — Celui-ci mélange une certaine quantité de crachats à un volume égal de solution concentrée de borax. Il agite dans un flacon bouché jusqu'à ce que le mélange soit homogène.

2° MÉTHODE DE WENDRIMER. — On emploie, au lieu d'une solution simple de borax, une solution saturée de borax et d'acide borique.

3° MÉTHODE DE STROSCHEIM. — Elle est tout à fait analogue à celle de Wendrimer.

4° MÉTHODE DE DILG. — Le crachat est agité avec quelques gouttes d'ammoniaque, puis avec un volume égal de solution de chlorure de sodium à 25 pour 100. Ces méthodes sont tout à fait imparfaites, et elles n'ont pour elles que leur ancienneté (1895), bien que la toute première, celle de Biedert (1891), qui fut abandonnée sans qu'on sache pourquoi, employait des moyens beaucoup plus perfectionnés.

Dans ces méthodes, il y a une simple dilution du crachat, facilitant la mise en liberté des bacilles pris dans des « bouchons » ; mais, comme ces méthodes ignorent la notion de densité du bacille et que le milieu reste en général d'une densité supérieure à 1.010, la centrifugation n'entraîne que très peu de parcelles, et l'enrichissement est pour ainsi dire inexistant.

b) Dissolution par intervention d'alcalins

Ici, l'on est très surpris de rencontrer la plus ancienne en date des méthodes d'homogénéisation (méthode de Biedert, 1886-1891) et la méthode encore la

plus couramment employée de nos jours : la méthode de Bezançon.

MÉTHODE DE BIEDERT. — Biedert conseille de faire bouillir le crachat avec de la lessive de soude en ajoutant un peu d'eau, laisser reposer, examiner le dépôt.

Ce procédé est bon, et il assure une bonne fluidification du crachat. Les variantes, qui lui furent données dans la suite, vont avoir le gros inconvénient de fournir un précipité abondant ; mais il faut se souvenir que la centrifugation n'étant pas encore adoptée, ce précipité aura au moins l'avantage d'entraîner les bacilles. Ces variantes sont :

1° Celle de CZAPLEWSKI, qui neutralise le crachat traité par la soude avec de l'acide acétique ;

2° Celle de COURTADE-ARNAUDE, qui fait de même, puis remet après décantation le précipité en solution dans une nouvelle liqueur de soude, agite avec de l'éther et cherche les bacilles dans la pellicule qui s'est formée au contact des deux liquides ;

3° Celle de BEITZKE, qui neutralise aussi à l'acide, ajoute de l'alcool et centrifuge.

Ces deux dernières variantes vont devenir des points capitaux des méthodes actuelles.

MÉTHODE DE BEZANÇON ET PHILIBERT. — C'est la méthode la plus couramment employée aujourd'hui, et, de fait, elle a de grands mérites. Elle fluidifie assez bien le crachat, de plus

1° Elle utilise la notion de densité du bacille, que leurs auteurs ont mis complètement au point ;

2° Elle emploie la centrifugation qui permet un examen rapide.

Voici la méthode telle qu'elle est exposée dans le *Traité de l'Examen des crachats* » (1) :

1° Mesurer la quantité de crachats que l'on a à sa disposition dans une éprouvette graduée. Mesurer une quantité d'eau dix fois supérieure. Mettre le crachat et la moitié de l'eau dans une capsule de porcelaine et ajouter autant de goutte de lessive de soude qu'il y a de centimètres cubes de crachat. Par exemple

Crachat	10 cm ³
Eau	100 cm ³
Lessive de soude.....	X gouttes.

2° Porter la capsule sur la flamme d'un bec Bunsen et chauffer doucement, en agitant constamment ; ajouter petit à petit le reste des 100 cm³ d'eau. Chauffer environ 10 minutes.

2° Laisser refroidir l'homogénéisation ;

4° Prendre la densité ;

5° Si la densité dépasse 100°, ajouter un peu d'alcool à 50°, jusqu'à ce que la densité soit retombée à 0,999-1.000 ;

6° Prélever deux ou quatre tubes à centrifuger de l'homogénéisation et centrifuger pendant trois quarts

(1) Besançon et S. I. de Jong.

d'heure à une heure dans une turbine ou dans un centrifugeur électrique ;

7° Décanter et étaler le culot sur une lame ou deux (suivant l'abondance) ; laisser sécher ;

8° Colorer par la méthode de Ziehl-Nielsen.

Avantages de la méthode. — Nous les avons déjà signalés plus haut.

Désavantages. — a) La grande dilution imposée au crachat, rendant l'opération longue et fastidieuse ;

b) Très souvent une fluidification un peu insuffisante de certaines parcelles du crachat ;

c) Centrifugation très longue, le culot étant lent à se former.

Si l'on juge cette méthode au point de vue chimique, on est amené à se demander : quel rôle la soude joue-t-elle ?

La soude, d'après les recherches que nous avons faites,

1° se fixe sur la mucine ;

2° elle ne l'hydrolyse pas.

Elle se fixe sur la mucine. — En effet, si l'on prépare une liqueur de soude identique comme concentration et comme volume à la formule

Crachat, n cm³

Eau, $10 n$ cm³

Lessive de soude, n gouttes,

on s'aperçoit, par titrage à l'acide sulfurique N/10, qu'après le chauffage il y a un décalage entre le flacon contenant le crachat et celui ne contenant qu'une solution de soude.

Voici quelques résultats de nos dosages :

Crachat	Alcalinité d'une solution de soude équimoléculaire en NaOH	Alcalinité du crachat après chauffage en NaOH	Différence
7 cm ³	0 gr. 12	0 gr. 10	0,02
12 cm ³	0 gr. 30	0 gr. 26	0,04
20 cm ³	0 gr. 45	0 gr. 40	0,05
22 cm ³	0 gr. 51	0 gr. 46	0,05

On voit qu'il se fixe en moyenne 0 gr. 0025 de soude par cm³ de crachat.

Quelle est la combinaison intime de la soude avec la mucine ? C'est ce que la chimie ne dit pas ; cependant on peut penser qu'il y a là un phénomène très voisin des alcali-albuminoïdes. Celles-ci sont caractérisées par le fait que les propriétés de l'albumine sur laquelle s'est fixé l'alcali ont légèrement varié et qu'au contact d'un acide elles reprennent toutes leurs propriétés primitives. L'expérience du blanc d'œuf chauffé avec quelques gouttes de lessive de soude est caractéristique. Au lieu de coaguler sous l'action de la chaleur, il donne au contraire un liquide très limpide ; mais, si on neutralise cette solution, même par un acide faible (acide acétique), il se prend immédiatement en masse.

Elle ne s'hydrolyse pas. — En effet, si l'on fait bouillir quelques centimètres cubes du liquide homogénéisé avec de la liqueur de Fehling, celle-ci prend une teinte violette, qui n'est autre que la coloration du biuret (bien naturelle dans un milieu albumineux),

mais il ne se forme pas de réduction. Donc pas de glucosamine.

D'autre part, nous avons recherché les peptones, qui abondent toujours dans les produits d'hydrolyse des albumines. Pour cela, nous avons évaporé le liquide homogénéisé dans le vide, à très douce température. Le résidu sirupeux est additionné de 20 cm³ d'alcool à 50; ou filtré. Ce liquide est évaporé à nouveau, dans le vide, à basse température. Il reste un liquide aqueux sur lequel nous avons effectué la recherche des peptones par le réactif de Tanret. La réaction est très faible (1).

B

Homogénéisation par hydrolyse

Dans ce groupe rentrent toutes les méthodes qui utilisent les oxydants alcalins (hypochlorites, hypobromites). Leur emploi n'est pas nouveau. En 1900, deux Français : DE LANNOISE et GIRARD, conseillent la méthode suivante :

Le crachat est jeté dans 10 fois son volume d'eau de Javel diluée au tiers ; on agite et on laisse déposer vingt-quatre heures, ou mieux, on centrifuge tout le

(1) La tyrosine semble disparaître au cours de cette réaction ; en effet la réaction à la ninhydrine est négative. Ce qui indique en outre que l'hydrolyse si elle avait eu lieu n'aurait pas été jusqu'au stade acide-animé.

liquide en un seul tube, en dissociant chaque fois la partie supérieure. On conserve le culot avec 2 ou 3 centimètres cubes de liquide et on l'additionne de 5 ou 6 gouttes de solution de soude (40 gr. NaOH par litre); on remplit le tube d'eau et on centrifuge. Le dernier culot est examiné. C'est une méthode à deux homogénéisations successives.

Plus tard, une série d'auteurs allemands décrivent une méthode analogue, la *méthode à l'antiformine*. L'antiformine est un mélange d'eau de Javel et de soude : « On dissocie les crachats dans un peu d'eau distillée, on ajoute cinq fois leur volume d'antiformine à 40 %, on place à 37° ; en deux ou trois heures, la masse est liquéfiée. A ce moment, on ajoute de la ligroïne sur une épaisseur de 2 à 3 millimètres ; agiter fortement, puis laisser reposer à l'étuve ; les gouttelettes de ligroïne remontent à la surface, entraînant les bacilles. Après une demi-heure de repos, on prélève la partie profonde (souvent blanchâtre) de la couche de ligroïne, et on examine après coloration.

Tout récemment, les méthodes aux oxydants alcalins utilisant la notion de densité bacillaire conseillent, au lieu de ligroïne, d'ajouter de l'alcool à la solution obtenue en mélangeant le crachat et l'hypochlorite et de centrifuger.

Voici deux méthodes récentes donnant le processus opératoire que l'on utilise maintenant :

1° MÉTHODE A L'HYPPOCHLORITE. — On ajoute au crachat son volume de solution d'hypochlorite concentrée (liqueur de Labarraque ou eau de Javel), on

chauffe légèrement. Le crachat se fluidifie. On ajoute alors un volume d'alcool à 90° (de l'alcool à brûler même) égal au volume du crachat ; on centrifuge.

2° MÉTHODE A L'HYPOBROMITE (1). — On mélange :
Crachat, : 1 volume ;
Réactif A (hypobromite Yvon fraîchement préparé, 1/2 volume ;

Réactif B (hyposulfite de soude à 50 %, 1/2 volume ;
Solution C (alcool à 50°), 2 volumes.

On agite à froid ; on peut aussitôt centrifuger ou, à défaut, laisser reposer.

Avantages de ces méthodes. — 1° La fluidification est meilleure qu'avec la solution de soude ;

2° Elles emploient un taux de dilution très peu élevé, et cela sans que les bacilles en soient altérés

Désavantages. — Nous l'avons déjà signalé plus haut ; il est unique : c'est l'abondance du culot avec lequel on pourrait préparer plusieurs lames. (On pourrait ajouter aussi la faible adhérence du frottis à la lame, qui s'explique comme nous le verrons ; mais, si l'on prend la précaution de laver tout doucement les préparations, on n'a pas de risque de décoller celles-ci.)

Ici, comme précédemment, nous avons procédé à l'analyse du produit d'homogénéisation, et nous avons pu constater que la mucine était partiellement hydrolysée. En effet, si l'on fait bouillir quelques centimè-

(1) L. Devillers.

tres cubes du liquide avec la liqueur de Fehling, il y a réduction. D'autre part, en traitant le liquide par évaporation dans le vide et reprise par l'alcool à 50°, on a un liquide aqueux résiduel qui donne un précipité très abondant par le réactif de Tanret, précipité soluble à chaud (peptones de Kühne) (1).

Ce sont ces peptones ainsi que la mucine inaltérée qui sont les constituants principaux du précipité abondant dont nous avons parlé. En effet, si l'on examine chimiquement le culot de centrifugation, on constate :

- 1° Qu'il donne une réaction de biuret intense ;
- 2° Qu'il est insoluble dans la soude, même concentrée ;
- 3° Qu'il est granuleux et adhère mal au verre.

Ce sont là les caractéristiques des peptones. D'autre part, le bleu de Unna donne par places, avec les frottis préparés avec le culot, une coloration rose, et ceci d'autant plus que le crachat était plus épais. Il ressort donc que la mucine est, selon les cas, hydrolysée en plus ou moins grande quantité et que, pour obtenir un culot très faible ne contenant, pour ainsi dire, que les éléments cellulaires et les bacilles, il faudrait :

- 1° *Le débarrasser totalement de la mucine.*
- 2° *Le débarrasser des peptones.*

(1) L'hydrolyse ne va pas plus loin que le stade peptones, car la recherche des acides-animés est négative ; la tyrosine disparaît même au cours de cette hydrolyse.

Pour obtenir l'hydrolyse totale de la mucine, dans bien des cas, les mélanges alcalins oxydants précités suffisent ; dans nombre d'autres, ils ne suffisent pas. Nous avons fait plusieurs essais et de ceux-ci il résulte que l'hypobromite fraîchement préparé est bien supérieur aux hypochlorites comme hydrolysant. A froid, il donne une plus grande quantité de glucosamine que les hypochlorites à chaud ; à chaud, il détruit même les bacilles. Nous avons alors définitivement adopté l'hypobromite, suivant une formule très concentrée :

Brome : 10

Eau : 50.

Lessive de soude : 50.

De plus, nous préparons l'hypobromite au moment même de l'homogénéisation. Pour cela, nous disposons d'un petit appareil qu'il est très facile de se construire avec une burette de Môhr et une éprouvette graduée. Le brôme reste en permanence dans une petite burette graduée au dixième de centim. cube bouchée à l'émeri et dont le robinet est soigneusement graissé. La burette se tient fixée dans le bouchon en caoutchouc ou même en liège qui obture une petite éprouvette graduée en centimètres cubes (1). Ai-je besoin de 8, 10, 15, 20 centimètres cubes d'hypobromite, je verse dans l'éprouvette eau et lessive de soude en parties égales, pour obtenir ma

(1) La maison LEUNE nous a construit un petit appareil très pratique correspondant à cette description, mais on peut se construire un appareil analogue avec des moyens de fortune.

quantité, et, tout doucement, je fais tomber le dixième de cette quantité de brome ; la réaction est instantanée, inodore et l'hypobromite obtenu répond à tous les desiderata.

Pour se débarrasser des peptones, qui sont, après la précipitation qui s'est effectuée au contact de l'alcool, à peu près insolubles, nous avons cherché un corps qui, changeant la viscosité du milieu, empêche leur précipitation, tout en n'arrêtant pas celle des bacilles. La glycérine que nous employions primitivement donnait une trop grande viscosité au milieu ; nous avons alors cherché un alcool de poids moléculaire élevé, et d'un usage fréquent. L'alcool amylique a répondu en tous points à ce que nous cherchions. Si l'on ajoute au liquide homogénéisé quelques centimètres cubes d'alcool amylique, puis de l'alcool ordinaire à 90° par petites portions, jusqu'au moment où tout le milieu est parfaitement homogène, sans présenter de couches de liquides superposées (mais sans dépasser ce point), le culot de précipitation est très faible et très chargé en éléments cellulaires et en bacilles. A titre de contrôle, une solution de peptone liquide traitée par l'alcool pur, puis dans un autre tube, par la même quantité d'alcool, mais additionnée d'un peu d'alcool amylique, a donné les mêmes différences. Dans le premier tube, un précipité abondant, granuleux ; dans l'autre à peu près rien.

Voici quelles sont donc les modifications que nous avons apportées aux méthodes d'homogénéisation. *Nous avons adopté la méthode à l'hypobromite, en*

l'employant *fraîche*, et en *augmentant sa teneur en alcalin et en brome*. Nous ajoutons, au moment de la concentration, un peu *d'alcool amylique*, pour diminuer le précipité.

Telle quelle, cette méthode nous a donné de bons résultats ; nous avons signalé au début de ce travail les enrichissements en bacilles qu'elle nous a permis ; en plus de cela les préparations y gagnent en netteté. Devillers signale dans son travail que l'action de l'hypobromite appliquée sur un frottis direct enrichit la préparation en bacilles, parce qu'il détruit « quelque chose » qui « en plus de la gaine cireuse s'oppose à la pénétration de la matière colorante ». Ce « quelque chose » n'est autre que la mucine, car les bacilles, après le traitement par notre méthode à l'hypobromite concentré, prennent très vivement la couleur et le fond n'étant pas chargé de granulations inutiles, ils se détachent très bien au milieu des éléments cytologiques qui ont aussi résisté à l'hydrolyse (1).

(1) Nous n'avons pas mentionné dans les méthodes par hydrolyse, celles qui utilisent la pancréatine (l'hydrolyse y est partielle aussi) car l'adjonction de poudre de pancréatine insoluble constitue à notre avis un très fort grief contre cette méthode.

CHAPITRE III

Exposé complet de notre méthode d'homogénéisation

1° On verse le crachat dans une éprouvette graduée. On note le nombre de centimètres cubes.

2° On prépare une solution de soude (parties égales de lessive de soude et d'eau) équivalente au crachat.

3° On verse dans cette solution le dixième de son volume de brome.

4° Cette solution d'hypobromite est versée dans l'éprouvette contenant le crachat et laissée en contact avec lui une heure ou deux à froid.

5° On ajoute quelques centimètres cubes d'alcool amylique, le quart environ du volume devant lequel on se trouve, on agite.

6° On ajoute par petites portions l'alcool à 90°, jusqu'à ce que l'alcool amylique soit dissous et ne forme pas un liquide superposé, mais sans dépasser cette limite.

7° On centrifuge.

8° Etaler le culot sur lame, sécher et fixer en trempant la lame dans une solution d'alcool contenant un dixième d'acide acétique (ce procédé enlève le dépôt de soude dû aux manipulations précédentes) (1).

9° Colorer par la méthode de Ziehl-Nelsen, ou mieux de Ziehl-Cepède, qui donne de très belles préparations.

Exemple d'un liquide total de notre homogénéisation prêt à être centrifugé.

Crachat : 10 cm³.

Solution de soude : 10 cm³ (5 cm³ lessive de soude, 5 cm³ eau).

Brome : 1 cm³.

Alcool amylique : 5 cm³.

Alcool à 90° : environ 12 à 13 cm³.

(1) Cette méthode de fixation est très importante pour obtenir une jolie coloration ; en effet la soude en dépôt détruit en partie à chaud la solution de fuchsine.

CONCLUSIONS

La conclusion de ce travail sera :

1° Que les réactions chimiques effectuées sur le crachat, pour la recherche de la tuberculose, sont sans grande valeur. La dernière en date, la tyrosino-réaction effectuée avec la macération de *Russula delica* est imprécise, en raison d'un facteur que nous avons mis en vedette : la réaction du milieu ; la tyrosinase cesse d'agir avec un $\text{pH} = \text{à } 8,9$. D'autre part, la tyrosine est un élément à peu près constant du crachat purulent, comme le montrent les réactions à la ninhydrine.

2° Les méthodes d'homogénéisation employant la soude sont imparfaites, parce qu'elles n'hydrolysent pas la mucine, l'alcali étant simplement fixé sur la mucine.

3° Les méthodes aux oxydants alcalins concentrés sont préférables, parce qu'elles hydrolysent la mucine; il faut donc donner la préférence à celles qui

poussent cette hydrolyse le plus loin possible ; nous donnons une formule d'hypobromite concentré, qui répond à ce desiderata.

4° Le seul inconvénient de la méthode aux oxydants alcalins : la précipitation des peptones, peut être obvié, grâce à l'addition d'alcool amylique avant celle d'alcool éthylique.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,

Vu :

GUIART

LE DOYEN,

JEAN LÉPINE.

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 19 Mai 1925

**LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
CAVALIER.**

BIBLIOGRAPHIE

BEZANÇON et S. I. DE JOUG. — Traité de l'examen des crachats.

GUIART et GRIMBERT. — Diagnostic chimique, microscopique et parasitologique.

HUGOUNENCO. — Précis de chimie physiologique et pathologique.

JACOBSON. — Compte rendu des séances de la Société de Biologie.

L. DEVILLERS. — Bulletin de la Société des dispensaires antituberculeux de l'Office public d'Hygiène sociale du département de la Seine, 1923, N° 7.

G. RODILLON. — La Pharmacie française, septembre, octobre, novembre 1924.

— La Pharmacie française, avril 1923.

D^r GATÉ et D^r PAPACORTAR. — C. R. Société de Biologie de Lyon, 15 décembre 1923.

Mlle PAVLOVITCH. — Thèse de la Faculté de Médecine de Lyon, 1924.

F. BEZANÇON. — L'Union pharmaceutique et le Bulletin commercial (réunis). Février, mars 1924.

TABLE DES MATIÈRES

Préface	7
Avant-Propos.	11
Chapitre premier. — Composition chimique du crachat pathologique	15
Chapitre II. — Etude des méthodes d'homogénéisation et de concentration des crachats.	27
A. — Homogénéisation par simple dissolution	28
B. — Homogénéisation par hydrolyse	34
Chapitre III. — Exposé complet de notre méthode d'homogénéisation	41
Conclusions	43
Bibliographie.	45
